

Е. И. КОМАР, М. И. ШАВЕЛЬ, А. Г. ПЕШНЯКЕВИЧ

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЯ КАРТОФЕЛЯ В БЕЛАРУСИ

Рассмотрена физиолого-биохимическая характеристика грамотрицательных пектолитических фитопатогенных бактерий, а также видовая идентификация бактерий рода *Pectobacterium* методом ПЦР-диагностики. Для идентификации изолированных нами штаммов фитопатогенных бактерий использовались праймеры, специфичные к генам, кодирующим белки системы секреции III типа: *dspE*, *hrpN*, *hrpL* и *hrpJ*. При изучении разнообразия пектолитических фитопатогенных возбудителей заболеваний картофеля на современном этапе в сравнении с 1970–80-ми гг. можно наблюдать большее видовое разнообразие, в том числе нами выявлены и описаны представители рода *Dickeya* sp., которые раньше не встречались на территории Беларуси. Результаты амплификации с праймерами к генам *dspE*, *hrpN*, *hrpL* и *hrpJ* показали, что не все перечисленные пары праймеров пригодны для достоверной видовой идентификации грамотрицательных пектолитических фитопатогенных бактерий.

Ключевые слова: картофель; мягкая гниль; *Pectobacterium carotovorum*; *Pectobacterium atrosepticum*; *Dickeya* sp.; ПЦР; фитопатогенные бактерии; хранение.

Current issue is devoted to physiological and biochemical characteristic of gram-negative pectinolytic phytopathogenic bacteria, as well as bacteria of *Pectobacterium* genus special identification using method of PCR diagnostics. Specific primers (for genus *dspE*, *hrpN*, *hrpL* and *hrpJ*) were used for identification of phytopathogenic bacteria isolated by us. During studying of variety of pectolytic phytopathogenic bacteria causes of potato diseases nowadays one can notice more special variety in comparison with the variety during 1970–80s. Amongst others we identified and described representatives of *Dickeya* sp., that were not met on Belarusian area previously. Results of amplification using primers for genus *dspE*, *hrpN*, *hrpL* and *hrpJ* showed that only some of listed primer pairs are applicable for reliable identification of gram-negative pectolytic phytopathogenic bacteria to the species level.

Key words: potato; storage; soft rot; phytopathogenic bacteria; *Pectobacterium carotovorum*; *Pectobacterium atrosepticum*; *Dickeya* sp.; PCR.

Фитопатогенные пектолитические бактерии способны к продукции и секреции набора экзоферментов, деполимеризующих компоненты клеточной стенки растений [1]. Они вызывают наиболее распространенные заболевания картофеля – черную ножку и мягкую гниль [2].

Черная ножка – одна из самых вредоносных бактериальных болезней картофеля. Заболевание получило свое название из-за загнивания нижней части стебля молодых растений. Болезнь распространена практически во всех странах, где возделывается картофель. В нашей стране заболевание также отмечено повсеместно, наибольший ущерб оно наносит в годы с прохладным летом и избыточным количеством осадков. Установлены зоны его распространения: зона слабого проявления – Брестская, юго-восток Гомельской и южная часть Гродненской области; зона среднего проявления – центральные районы Гродненской, Гомельской и юго-запад Минской области; зона сильного развития – Могилевская, Витебская и северо-восток Минской области. Эти различия определены погодными и почвенными условиями [3–6]. В годы с небольшим количеством осадков и высокими летними температурами инфекция находится в скрытом состоянии, при этом внешние признаки поражения растений могут отсутствовать [3, 4]. Распространяясь по сосудам, фитопатогенные бактерии через столоны проникают в молодые клубни, и при наступлении благоприятных условий развивается клубневая форма поражения картофеля черной ножкой, известная под названием мокрой (мягкой) гнили. Традиционно возбудителями черной ножки у вегетирующих растений на территории Беларуси считаются фитопатогенные бактерии *Pectobacterium atrosepticum* (*Pat*) – вид, ранее известный как *Erwinia carotovora* (*Eca*) subsp. *atroseptica* [7, 8]. Однако необходимо отметить, что в 2009 г. в результате анализа пораженных черной ножкой и мокрой гнилью образцов картофеля из Липецкой области впервые были выделены патогенные штаммы, которые идентифицированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализ) как *Dickeya dianthicola* – вид, ранее известный как *Erwinia chrysanthemi* [9]. К настоящему времени в Российской Федерации заболевание картофеля, вызванное возбудителями данного вида, обнаружено в ряде регионов страны, в том числе в Воронежской, Московской и Нижегородской областях. Погодные условия вегетационных сезонов 2008–2010 гг. могли спровоцировать проявление, а затем обусловить широкое распространение новой формы черной ножки [10–12]. Это позволяет ожидать проникновения этого патогена на территорию нашей республики.

Мягкие гнили, возбудителем которых являются бактерии вида *Pectobacterium carotovorum* (*Pca*), ранее известные как *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* [7, 8], развиваются в поле на участках с избыточной влажностью. При этом следует отметить, что наибольший ущерб возбудители мягкой гнили причиняют в период хранения картофеля, что обусловлено его неправильным режимом: недостаточной вентиляцией, влажностью выше 90 % и температурой воздуха выше 15–18 °C [13].

Традиционно развитие мягких гнилей связывают с продукцией и секрецией фитопатогеном набора

экзоферментов, деполимеризующих клеточную стенку растения, в первую очередь различных пектиназ и целлюлаз [14]. Некоторые авторы полагают, что бактерии *Pca* не способны проникать через неповрежденную кожуру картофеля и инфицировать здоровые клубни, а естественным путем проникновения данного возбудителя в клубень являются механические повреждения его поверхности в результате поражения вредителями, при уборке и транспортировке урожая [15]. Однако не следует забывать, что при проникновении чужеродного агента растение реагирует и на раневое повреждение непосредственно, и на внедрение предполагаемого возбудителя заболевания активацией определенных защитных механизмов, которые необходимы для ограничения распространения присутствующих в раневой зоне патогенов [15]. Считается, что для успешного инфицирования картофеля возбудитель, вероятно, может блокировать сигнальные каскады растения, приводящие к индукции защитного ответа, тем самым оказывая противодействие защитной реакции растения [14].

Ранее сотрудниками кафедры молекулярной биологии было показано, что бактерии *Pca* используют аппарат системы секреции III типа (ССТТ) для доставки одного из факторов вирулентности, белка DspE, непосредственно в клетки растений. Транспорт этого белка в клетки устойчивых растений приводит к индукции реакции гиперчувствительности (РГ), ограничивающей дальнейшее распространение патогена, что позволяет отнести DspE к классу Avr-белков [16, 17]. Е. А. Николайчик и др. [14] предполагают, что при совместимом взаимодействии с чувствительным растением DspE каким-то образом изменяет метаболизм клетки растения в пользу патогена, скорее всего нарушая работу сигнальных цепей, запускающих защитные реакции.

Показано, что три субстрата ССТТ – белки HrpN, HrpW и HrpJ – непосредственно участвуют во взаимодействии с растениями. Они секретируются посредством ССТТ за пределы бактериальной клетки, но в отличие от эффектора DspE в цитоплазму клетки растения не транспортируются и относятся к классу вспомогательных, или хелперных, компонентов ССТТ. На протяжении более десяти лет сотрудниками кафедры молекулярной биологии ведется работа по изучению транспорта этих белков посредством ССТТ и их роли во взаимодействии патогена с растениями [16–22].

Существует несколько подходов к молекулярно-биологической идентификации с применением метода ПЦР. Первый – амплификация гена 16S рРНК с помощью пары праймеров 8f-1492R. Обычно применяют два основных способа анализа полученных продуктов амплификации: либо секвенирование, либо RFLP-анализ с последующим изучением рестрикционного полиморфизма. Первый способ дает более точные результаты, но требует дополнительного оборудования и больших материальных затрат по сравнению со вторым. При амплификации фрагментов ДНК фитопатогенных бактерий можно использовать праймеры к генам, которые определяют специфичность и уникальность патогена. Для идентификации изучаемых нами штаммов пектолитических бактерий были использованы праймеры, специфичные генам, кодирующим белки ССТТ: dspE, hrpN, hrpL и hrpJ, которые были любезно предоставлены доцентом кафедры молекулярной биологии, кандидатом биологических наук Е. А. Николайчиком.

Цель настоящей работы – физиолого-биохимическая характеристика граммотрицательных пектолитических фитопатогенных бактерий, а также видовая идентификация бактерий рода *Pectobacterium* с использованием метода ПЦР-диагностики.

Материалы и методы исследования

Непосредственным объектом исследования служили штаммы граммотрицательных пектолитических фитопатогенных бактерий, выделенные из образцов картофеля разных сортов с различными симптомами поражения, собранных на территории Беларуси в 2004, 2011 и 2012 гг. сотрудниками РУП «Институт защиты растений» (п. Прилуки).

В работе использовались также следующие штаммы: *Erw. chrysanthemi* (*D. dadantii*) ENA49, *P. carotovorum* j289 и 3-2 из коллекции фитопатогенных микроорганизмов кафедры микробиологии, а также штаммы *Pca* 2a и 14a, *P. atrosepticum* SCRI 1043, 21a, 36a из коллекции фитопатогенных микроорганизмов кафедры молекулярной биологии.

Определение фенотипических свойств исследуемых штаммов (грампринадлежность с раствором КОН, тест Хью – Лейфсона; наличие каталазы, оксидазы, нитратредуктазы, уреазы, аргининдегидролазы, амилазы, лецитиназы, липазы; рост при различных температурах, устойчивость к различным концентрациям хлорида натрия и чувствительность к эритромицину; способность утилизировать различные углеводы в качестве единственного источника углерода и энергии) проводили согласно стандартным методам, описанным в руководствах по идентификации бактерий [2, 23–25].

Патогенность выделенных культур оценивали по способности вызывать деградацию пектиновых веществ, мягкую гниль ломтиков картофеля, синтезировать и секретировать в окружающую среду целлюлазы [23].

Для проверки способности вызывать реакцию гиперчувствительности в листьях табака и бобов готовили суспензии клеток исследуемых штаммов в физиологическом растворе, содержащие 10^9 кл./мл ($ОП_{620}=1,0$). По 10 мкл суспензии инокулировали в паренхиму листьев табака и бобов с помощью шприца. Проявление реакции гиперчувствительности оценивали визуально через 24 ч.

В целях проверки способности поражать молодые вегетирующие растения и вызывать мягкую гниль использовали клубни картофеля. Для этого готовили суспензии клеток исследуемых штаммов в физиологическом растворе, содержащие 10^9 кл./мл ($ОП_{620}=1,0$). По 10 мкл суспензии инокулировали в паренхиму междоузлий стеблей с помощью шприца. Проявление симптомов заболевания оценивали визуально каждые 24 ч в течение недели. Поверхностно стерилизованные клубни картофеля заражали путем введения при помощи автоматической пипетки 20 мкл суспензий клеток изучаемых культур микроорганизмов. Зараженные клубни помещали на 3 дня в полиэтиленовые пакеты и выдерживали при 28 °С. Результаты теста считали положительными при развитии симптомов некроза растительной ткани в области инокуляции и распространения возбудителей по клубню с дальнейшей мацерацией пораженных участков.

Бактериальную хромосомную ДНК выделяли стандартным методом с использованием гексадецил-триметиламмонийбромидом (СТАВ) согласно методике, изложенной в руководстве [26]. Для молекулярно-биологической идентификации изолятов применяли метод ПЦР-диагностики праймерами к генам:

- *dspE* (*dspEf* 5'-ccgagcaggatcaccttacg-3'; *dspEr* 5'-cagcagatgttcagcggttaag-3');
- *hrpN* (*hrpNf* 5'-ggatgaatgccatgaatccatcg-3'; *hrpNr* 5'-gctgtttgttcgaaaagcc-3');
- *hrpL* (*hrpLf* 5'-gcgatgagatgctggaacatcg-3'; *hrpLr* 5'-cttcaggcagtgagacgatgg-3');
- *hrpJ* (*hrpJf* 5'-agcagacaagttcgaccatg-3'; *hrpJr* 5'-ccgattcagcgattgtctcttc-3').

Последовательности вышеуказанных олигонуклеотидов и параметры амплификации были определены доцентом кафедры молекулярной биологии, кандидатом биологических наук Е. А. Николайчиком. ПЦР проводили в объеме 20 мкл. Состав смеси: 10 пМ каждого праймера, 0,2 ед. Taq ДНК-полимеразы, по 0,2 мМ дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ, 16 мМ сульфата аммония, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 10 нг ДНК. Параметры амплификации: начальная денатурация – 1 цикл – 94 °С, 5 мин; последующие 35 циклов, включая денатурацию, – 94 °С, 30 с, отжиг – 55 °С, 30 с и элонгацию – 72 °С, 30 с; завершающая элонгация – 1 цикл – 72 °С, 5 мин.

Результаты исследования и их обсуждение

Из представленных для изучения пораженных стеблей и клубней картофеля, выращенных в различных регионах Беларуси, были выделены 30 штаммов грамотрицательных подвижных пектолитических палочковидных бактерий. Результаты проведенных исследований ряда морфологических и физиолого-биохимических характеристик данных штаммов позволили нам разделить их на две основные группы (табл. 1). Для сравнения в табл. 1 приводятся данные по изучению фенотипических свойств типовых штаммов *Pat* SCRI 1043 и *Pca* j289.

Таблица 1

Физиолого-биохимические свойства изучаемых пектолитических бактерий

Группа (количество штаммов)	О/Ф-тест	Наличие ферментов						
		Амилаза	Каталаза	Оксидаза	НР	АД	Уреаза	Лецитиназа
1 (7)	F	+	+	–	+	–	–	+
2 (23)	F	–	+	–	+	–	–	+
<i>Pat</i> SCRI 1043	F	–	+	–	+	–	–	+
<i>Pca</i> j289	F	–	+	–	+	–	–	+

Примечание. Знак «+» – положительная реакция; знак «–» – отрицательная реакция; О/Ф-тест – окислительное (О) или ферментативное (F) образование кислоты из глюкозы; НР – нитратредуктаза; АД – аргининдегидролаза.

Как и ожидалось, значительную часть штаммов, выделенных из поврежденных гнилями клубней и мацерированных стеблей картофеля, составляют бактерии рода *Pectobacterium*. Однако при более детальном изучении оказалось, что данная группа бактерий является достаточно гетерогенной. Штаммы значительно различались между собой по характеру поражения тканей клубней картофеля и агрессивности, по симптомам поражения молодых вегетирующих растений, также наблюдались различия фенотипических свойств исследуемых штаммов (табл. 2).

Характеристика свойств изучаемых бактерий

Анализируемый признак	Группа (количество штаммов)			Pat SCRI 1043	Pca j289
	1 (7)	2a (14)	2б (9)		
Наличие активности: пектолитической целлюлолитической протеолитической	+	++	+	+	+
	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
Способность вызывать реакцию гиперчувствительности у растений: табака бобов	+	++	+	+	+
	+	++	+	+	+
Характер мацерации тканей клубня картофеля	Мацерация осуществляется с обильным выделением водянистого или слизистого экссудата. Мацерированная ткань имеет темно-коричневую окраску	Мацерация осуществляется с образованием мягкой гнили, мацерированная ткань молочно-белого цвета, при контакте с воздухом темнеет. Очень агрессивны	Медленная мацерация тканей клубня с образованием темно-коричневой и даже черной гнили	Медленная мацерация тканей клубня с образованием темно-коричневой гнили	Мацерация осуществляется с образованием мягкой гнили светло-коричневого цвета
Симптомы поражения молодых вегетирующих растений картофеля	Потемнение стебля в местах укола, затем распространение темных полос по стеблю, размягчение не наблюдается, скорее подсыхание	Размягчение стебля первоначально без изменения окраски, со временем мацерированные участки темнеют, при надавливании – выделение жидкого или слизистого экссудата	Почернение и быстрое засыхание стебля – симптомы черной ножки. Пораженные стебли под действием собственной массы падают	Почернение и быстрое засыхание стебля – симптомы черной ножки	Медленная мацерация стебля с образованием гнили бурого цвета
Рост при температурах, °C: 32 34 36 38 40	+	+	+	+	+
	+	+	±	±	+
	+	+	–	–	+
	+	±	–	–	±
	+	–	–	–	–
Устойчивость к NaCl, %: 4 5 6 7 8	+	+	+	+	+
	–	+	±	±	+
	–	+	–	–	+
	–	+	–	–	+
	–	–	–	–	–
Чувствительность к эритромицину, мкг/мл: 25 50 100	–	+	+	+	+
	–	+	+	+	+
	–	±	±	+	+
Липолитическая активность	+	+(50 % штаммов)	++	+	+

Примечание. Количество знаков «+» в столбцах указывает на степень активности фермента; либо «+» – наличие роста; знак «±» – слабо выраженный рост; знак «–» – отсутствие роста в случае определения роста при различных температурах, устойчивости к различным концентрациям хлорида натрия и чувствительности к эритромицину.

23 штамма бактерий рода *Pectobacterium*, составляющие группу 2, хорошо растут на минимальной питательной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии сахарозу, галактозу, арабинозу, декстрозу, лактозу, ксилозу, рамнозу, трегалозу, глицерин, маннит и салицил, хуже – на среде с инозитом и цитратом, не способны утилизировать дульцит и тартрат в качестве единственного источника углерода и энергии, и лишь единичные штаммы утилизуют мальтозу и сорбит. Разделение второй группы на две подгруппы, основанное на различиях фенотипических свойств, отражает различия видового порядка. На основании морфологических и физиолого-биохимических характеристик, а также по характеру поражения тканей клубней и стеблей картофеля при экспериментальном заражении суспензией бактерий представители данной группы были дифференцированы как *P. carotovorum* (группа 2а) и *P. atrosepticum* (группа 2б).

Существенным является выделение бактерий, близких по физиолого-биохимическим свойствам к роду *Dickeya* (ранее *Erw. chrysanthemi*) – группа 1, представители которого не встречались на территории Беларуси в 1970–90-е гг. Бактерии 7 штаммов, вошедших в первую группу, являются грамотрицательными подвижными палочками. Они наряду с признаками, указанными в табл. 1 и 2, способны утилизировать в качестве единственного источника углерода и энергии сахарозу, галактозу, арабинозу, декстрозу, лактозу, ксилозу, рамнозу, мальтозу, трегалозу, глицерин, маннит, сорбит, инозит, дульцит, салицил, цитрат, тартрат. Однако они характеризуются очень слабым ростом на минимальной среде с добавлением вышеуказанных углеводов, более обильный рост наблюдается на среде с тартратом и трегалозой. Необходимо также отметить, что для бактерий изучаемых штаммов необходима более высокая температура для проявления симптомов заболевания. Они способны расти в диапазоне температур от 14 до 40 °С, однако оптимальной для роста и развития является температура от 32 до 34 °С. Возможно, это находит отражение в проявлении симптомов заболевания стеблей картофеля в более поздний период вегетации, когда среднесуточная температура окружающей среды увеличивается.

Как видно из результатов электрофореза, представленных на рис. 1, специфические праймеры к гену *dspE* не пригодны для достоверной видовой и даже родовой идентификации пектолитических бактерий ввиду их невысокой специфичности по отношению к близкородственным видам.

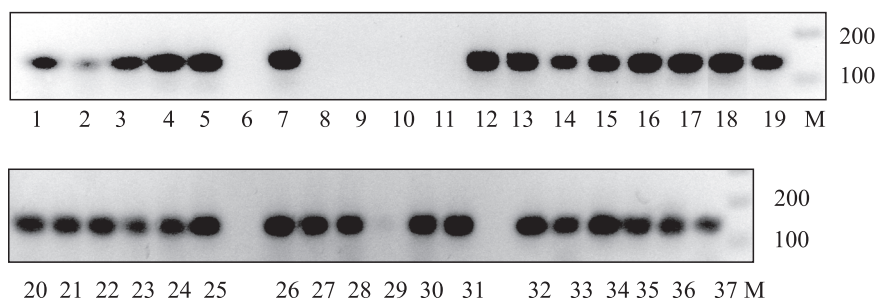


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *dspE*, полученных с использованием в качестве матрицы хромосомной ДНК, выделенной из исследуемых штаммов *Pca* – 3–11, 27–30; *Pat* – 1–2, 20–26; *Dickeya* sp. – 12–15, 31–33; коллекционные штаммы *Pca*: 16 – j289, 17 – 2а, 34 – 3-2, 35 – 14а; *Pat*: 18 – 36а, 36 – 21а, 37 – SCRI 1043; 19 – *Erw. chrysanthemi* (*D. dadantii*) ENA49; М – ДНК-маркер (GeneRuler DNA ladder mix, Fermentas)

При ПЦР-диагностике с парой праймеров *dspEf/dspEr* ПЦР-продукт обнаружен практически во всех пробах (кроме шести выделенных нами – дорожки № 6, 8–11, 29) с использованием в качестве матрицы ДНК как исследуемых штаммов *Pectobacterium* и *Dickeya*, так и коллекционных штаммов *Erw. chrysanthemi* (*D. dadantii*) ENA49, *P. carotovorum* j289, 3-2, 2а, 14а и *P. atrosepticum* SCRI 1043, 21а, 36а. На рис. 2 представлены результаты электрофореза в агарозном геле продуктов амплификации с применением праймеров к гену *hgrL*, которые свидетельствуют о том, что использование данных олигонуклеотидов дает нам возможность разделения грамотрицательных пектолитических фитопатогенных бактерий на самых ранних стадиях идентификации, а именно для отделения бактерий рода *Pectobacterium* от близких к ним по фенотипическим характеристикам штаммов *Dickeya* sp.

При ПЦР-диагностике с парой праймеров *hgrLf/hgrLr* ПЦР-продукты получились при использовании в качестве матрицы только ДНК штаммов рода *Pectobacterium*, причем как 23 описанных в настоящей работе, так и семи коллекционных, ни один из восьми исследуемых штаммов *Dickeya* не дал характерного продукта амплификации. При этом следует обратить внимание на незначительное преобладание размеров продуктов амплификации у выделенных нами из пораженного картофеля восьми штаммов *P. atrosepticum* над размерами продуктов амплификации у бактерий *P. carotovorum*.

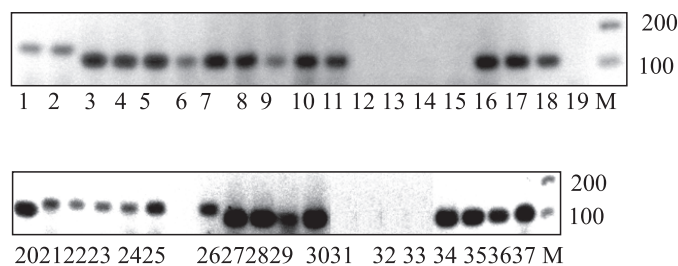


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *hrpL*, полученных с использованием в качестве матрицы хромосомной ДНК, выделенной из исследуемых штаммов *Pca* – 3–11, 27–30; *Pat* – 1–2, 20–26; *Dickeya* sp. – 12–15, 31–33; коллекционные штаммы *Pca*: 16 – j289, 17 – 2a, 34 – 3-2, 35 – 14a; *Pat*: 18 – 36a, 36 – 21a, 37 – SCRI 1043; 19 – *Erw. chrysanthemi* (*D. dadantii*) ENA49; М – ДНК-маркер (GeneRuler DNA ladder mix, Fermentas)

Результатом данного этапа исследования также является то, что специфические праймеры к генам *hrpN* и *hrpJ* могут успешно применяться для достоверной видовой идентификации пектолитических бактерий вида *P. carotovorum* в связи с тем, что характерный продукт амплификации получается только в случае использования в качестве матрицы ДНК бактерий данного вида, как коллекционных штаммов, так и выделенных нами. На рис. 3 представлены результаты электрофореза в агарозном геле продуктов амплификации с использованием праймеров к гену *hrpJ*.

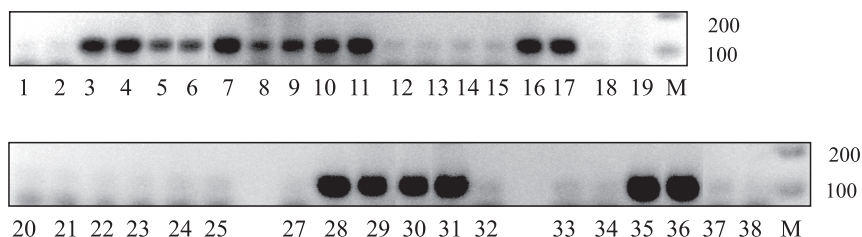


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *hrpJ*, полученных с использованием в качестве матрицы хромосомной ДНК, выделенной из исследуемых штаммов *Pca* – 3–11, 28–31; *Pat* – 1–2, 20–27; *Dickeya* sp. – 12–15, 32–34; коллекционные штаммы *Pca*: 16 – j289, 17 – 2a, 35 – 3-2, 36 – 14a; *Pat*: 18 – 36a, 37 – 21a, 38 – SCRI 1043; 19 – *Erw. chrysanthemi* (*D. dadantii*) ENA49; М – ДНК-маркер (GeneRuler DNA ladder mix, Fermentas)

Аналогичная картина наблюдалась и при использовании пары праймеров *hrpNf/hrpNr*.

Таким образом, результаты амплификации с праймерами к генам *dspE*, *hrpN*, *hrpL* и *hrpJ* показали, что не все перечисленные пары праймеров пригодны для достоверной видовой идентификации грам-отрицательных пектолитических фитопатогенных бактерий.

При изучении разнообразия пектолитических фитопатогенных возбудителей заболеваний картофеля на современном этапе в сравнении с 1970–80-ми гг. очевидно большее видовое разнообразие, в том числе нами выявлены и описаны представители рода *Dickeya* sp., которые раньше не встречались на территории Беларуси.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ-Минобразования (грант № Б14МВ-006).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Третьякова О. М., Евтушенков А. Н. Пектолитическая и мацерующая активность штаммов *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* и *Dickeya dadantii* на тканях клубней картофеля // Картофелеводство. Минск, 2010. № 18. С. 186–190.
2. Bradbury J. F. Guide to plant pathogenic bacteria. Wallingford, 1986.
3. Турко С. А., Ильяшенко Д. А., Иванюк В. Г., Калач В. И. Рекомендации по защите картофеля от клубневых гнилей во время хранения. Самохваловичи, 2010.
4. Иванюк В. Г., Банадысев С. А., Журомский Г. К. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. Минск, 2005.
5. Малиновская Л. В. Создание исходных форм картофеля, устойчивых к бактериальным болезням // Картофелеводство. 2000. № 10. С. 81–85.
6. Морозкина Е. В., Бусько И. И., Ильяшенко Д. А. Бактериальные болезни картофеля в Беларуси // Земляробства і ахова раслін. 2011. № 5. С. 30–34.
7. Hauben L., Moore E. R., Vauterin L., Steenackers M., Mergaert J., Verdonck L., Swings J. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae* // Syst. Appl. Microbiol. 1998. Vol. 3. P. 384–397.
8. Gardan L., Cecile G., Christen R., Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. // International J. of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003. Vol. 53. P. 381–391.
9. Samson R., Legendre J. B., Christen R., Fischer-Le Saux M., Achouak W., Gardan L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov.

as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. // International J. of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005. Vol. 55. P. 1415–1427.

10. Карлов А. Н., Зотов В. С., Пехтерева Э. Ш., Матвеева Е. В., Джалилов Ф. С., Фесенко И. А., Карлов Г. И., Игнатов А. Н. *Dickeya dianthicola* – новый для России бактериальный патоген картофеля // Изв. Тимирязев. с.-х. акад. 2010. № 3. С. 134–141.

11. Карлов А. Н., Игнатов А. Н., Карлов Г. И. Диагностика бактериального патогена картофеля *Dickeya dianthicola* // Изв. Тимирязев. с.-х. акад. 2011. № 3. С. 38–48.

12. Лазарев А. М. Новый возбудитель бактериоза картофеля атакует российские поля // Защита и карантин растений. 2013. № 6. С. 11–15.

13. Иванюк В. Г., Ерчик В. М., Райко А. М. Бактериальные гнили клубней картофеля при хранении // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, М-во сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет». Гродно, 2005. № 4. С. 287–290.

14. Николайчик Е. А., Хомская Л. Л., Игнатенко Е. И. Фитопатоген *Pectobacterium carotovorum* использует аппарат секреции III типа для блокирования системного защитного ответа растения-хозяина // Труды БГУ. 2009. Т. 4, ч. 1. С. 197–204.

15. Perombelon M. C. M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis // Plant Pathology. 2002. Vol. 51. P. 1–12.

16. Николайчик Е. А., Овчинникова Т. В., Валентович Л. Н., Губич О. И., Шолух А. Н., Евтушенков А. Н. Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в клетки *Nicotiana tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности // Докл. НАН Беларуси. 2005. № 5. С. 81–85.

17. Николайчик Е. А., Лагоненко А. Л., Валентович Л. Н., Лешкович И. И., Овчинникова Т. В., Присяженко О. К., Доружинская Н. Г., Лиморова И. М., Евтушенков А. Н. Молекулярные механизмы взаимодействия фитопатогенных бактерий *Erwinia* с растениями // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2006. № 3. С. 60–64.

18. Николайчик Е. А., Присяженко О. К., Кулик Е. В., Валентович Л. Н., Чжан Янь (КНР), Селезнева Ю. В., Евтушенков А. Н. От бактериальных генов – к трансгенным растениям // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2011. № 3. С. 69–73.

19. Николайчик Е. А., Лагоненко А. Л., Валентович Л. Н., Присяженко О. К., Евтушенков А. Н. Сравнительная характеристика харпинов HrpN *Erwinia carotovora* и *Erwinia amylovora* // Докл. НАН Беларуси. 2007. № 3. С. 81–85.

20. Присяженко О. К., Николайчик Е. А., Евтушенков А. Н. Экспрессия гена харпина hrpN *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в растениях табака индуцирует гены устойчивости // Докл. НАН Беларуси. 2007. Т. 51, № 5. С. 85–89.

21. Лагоненко А. Л., Николайчик Е. А., Евтушенков А. Н. Характеристика харпина HrpW бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* // Докл. НАН Беларуси. 2006. Т. 50, № 1. С. 70–73.

22. Лагоненко А. Л., Овчинникова Т. В., Николайчик Е. А., Евтушенков А. Н. Характеристика белка HrpJ, компонента системы секреции III типа бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* // Докл. НАН Беларуси. 2004. Т. 48, № 5. С. 74–78.

23. Желдакова Р. А., Мямин В. Е. Фитопатогенные микроорганизмы. Минск, 2006.

24. Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria : in 2 vol. / ed. by D. J. Brenner, N. R. Krieg, G. M. Garrity, J. T. Staley. 2nd ed. New York, 2005. Vol. 2.

25. Goszczynska T., Serfontein J. J., Serfontein S. Introduction to practical phyto bacteriology. Safrinet, 2000.

26. Ausubel F. A., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. Current protocols in molecular biology : in 2 vol. New York, 1999.

Поступила в редакцию 21.04.2014.

Елена Ивановна Комар – аспирант кафедры микробиологии. Научный руководитель – А. Г. Песнякевич.

Мария Игоревна Шавель – студентка 5-го курса биологического факультета.

Александр Георгиевич Песнякевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии.